

MULTILAYERED ANALYZING TOOL FOR MEASURING FRUCTSAMINE

Patent number: JP4110662
Publication date: 1992-04-13
Inventor: SAKAMOTO HISASHI
Applicant: KIYOUTO DAIICHI KAGAKU:KK
Classification:
- **International:** G01N33/66; C12Q1/00; C12Q1/26; G01N33/52
- **European:**
Application number: JP19900230912 19900830
Priority number(s):

Also published as:

EP0473189 (A2)
US5366868 (A1)
EP0473189 (A3)
EP0473189 (B1)

Abstract of JP4110662

PURPOSE: To obtain an analysis element which is measured simply in a short time by sequentially laminating a layer containing a buffer agent having the buffer capacity in the specified range and a layer containing tetrazolium salt on a liquid impermeable supporting material.

CONSTITUTION: A layer containing a buffer agent of pH 8 - 12 is applied on a liquid impermeable supporting body. A layer containing tetrazolium salt is formed on the layer containing the buffer agent. It is preferable as required that an intermediate layer, which prevents the contact between the buffer agent and the tetrazolium salt, is provided between the layer containing the buffer layer and the layer containing the tetrazolium. When uricase is contained in the layer containing the buffer agent, uric acid which is the reducing material in body fluid is decomposed in a short time. Therefore, the influence of the uric acid in measurement can be excluded, and the measuring time can be shortened.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-110662

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)4月13日

G 01 N 33/66
C 12 Q 1/00
1/26
G 01 N 33/52

B 7055-2 J
C 6807-4 B
6807-4 B
B 7055-2 J

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑭ 発明の名称 フルクトサミン測定用多層分析用具

⑮ 特 願 平2-230912

⑯ 出 願 平2(1990)8月30日

⑰ 発 明 者 坂 本 久 京都府八幡市男山雄徳7番地 E-16 202号

⑱ 出 願 人 株式会社京都第一科学 京都府京都市南区東九条西明田町57

⑲ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

フルクトサミン測定用多層分析用具

2. 特許請求の範囲

1. 液体不浸透性支持体、該支持体上に形成されたpH8~12の緩衝剤含有層、および該緩衝剤含有層上に形成されたテトラゾリウム塩含有層からなるフルクトサミン測定用多層分析用具。

2. 緩衝剤含有層およびテトラゾリウム塩含有層の間に、更にこれら両層の接触を防止する中間層を有する請求項1記載のフルクトサミン測定用多層分析用具。

3. 緩衝剤含有層がウリカーゼを更に含む請求項1記載のフルクトサミン測定用多層分析用具。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、体液、特に血清中のフルクトサミンを測定する為の多層分析用具に関する。

[従来の技術]

血清中フルクトサミンの測定は、ジョンソン

(Johnson) およびベイカー (Baker) によって、アルカリ条件下でのフルクトサミンの還元力をニトロテトラゾリウムブルー (NTB) で測定する方法が提案されている [クリニカ・キミカ・アクタ (Clinica Chimica Acta), 127 (1982) 87-95 および特公平1-13062号公報参照]。この方法は、フルクトサミン以外の血清中の還元性物質の影響を除く為に、10分間のブレインキューベーションを行い、その間にNTBと反応させて共存還元性物質を分解し、その後の5分間 (10分目から15分目) の間に反応するNTB量が血清中フルクトサミン量に比例するのでそれを測定するという方法である。

特開昭63-182567号公報には、検体中に共存する妨害物質を強塩基または酸化剤もしくは酵素で処理するか、あるいは脱塩して妨害物質を除去し、その後pHを10~14の間に調整して呈色物質 (テトラゾリウム塩) を加え、然る後に発色した色を測定するエンドポイントアッセイが開示されている。

特開昭63-15168号公報には、試料中の還元性成分及び／又は混濁成分を除去する為にはほぼ中性pHで試料を前処理し、その後、pH値を10～12に調節しかつ呈色試薬を添加する方法が開示されている。

特昭63-304999号公報には、試料溶液にpH9～12の緩衝剤溶液、呈色性化合物およびウリカーゼ、ならびに少なくとも1種の洗浄剤を加え、早くとも5分後に20～40℃の温度範囲で吸光度の時間的変化を反応速度論的に測定する方法が開示されている。

[発明が解決しようとする課題]

ジョンソンおよびベイカーの方法は、当業者で言うウエットケミストリーの方法であり、アルカリ条件下で37℃に温調し、10分から15分の吸光度変化を測定している。

また、体液試料中の還元性物質を前もって、酸化剤や酵素で分解した後、フルクトサミンの還元力を測定する方法が特開昭63-182587号公報に開示されているが、操作が2段階となり繁

雑で長時間を要する。

特開昭63-304999号公報にはアルカリ条件下で体液中の還元性物質や混濁を除去する為に酵素や酸化剤と同時に界面活性剤が使用されている。この場合にも還元性物質が消去され混濁が澄清化するまでに早くとも5分以上のブレインキュベーションの時間を要する。

上記従来技術に記載の方法はいずれもウエットケミストリーに属する測定方法であり、測定の際には、反応セルを用いて吸光度の変化を測定しなければならない。

一般に、フルクトサミンとの発色反応に用いられるテトラゾリウム塩の還元によって生成したホルマザンは、反応セルやフローセルに強固に付着してバックグラウンドを上昇させ、誤差の原因となる。特に近年、多くの施設に普及している自動分析機で測定した場合、反応管や輸送チューブ、フローセルに生成ホルマザンが沈着し、自動分析機を汚染して他の項目が測定できない状態になってしまう。さらに付着したホルマザンは取れにくい

為、強い酸や界面活性剤に各種器具、部品を1夜浸漬しなければならないと言う煩雑さがあった。

また、このフルクトサミンの測定試薬はpH10以上の強アルカリ性で、反応後の廃液は排水を強アルカリ性とし、環境汚染の原因となる。

一方、ウエットケミストリーに対してドライケミストリーと呼ばれる方法があるが、ドライケミストリーでは体液試料1滴(数μl)を用いて反応を行う為、10分以上反応させると乾燥が進行し、測定精度が悪くなるという欠点がある。測定時間を10分以内に短縮すると体液中の還元性物質の影響を受け、正確なデータが得られないという問題があった。

本発明は、これらの従来技術の問題点を解決すると共に、フルクトサミンの測定ではほとんど不可能と考えられていたドライケミストリー技術を応用して、体液中のフルクトサミンを短時間で簡易に測定する分析要素を提供するものである。

[課題を解決するための手段]

本発明は、上記課題を解決するため、液体不浸

透性支持体、該支持体上に形成されたpH8～12の緩衝剤含有層、および該緩衝剤含有層上に形成されたテトラゾリウム塩含有層からなるフルクトサミン測定用多層分析要素を提供する。

所望により、本発明のフルクトサミン測定用多層分析要素は、緩衝剤含有層とテトラゾリウム塩含有層との間に、緩衝剤とテトラゾリウム塩との接触を防止するための一種の保護層である中間層を有してよい。

本発明の多層分析要素では、液体不浸透性支持体としては、液体不浸透性のプラスチックフィルムが好ましく用いられるが、液体不浸透性であれば他の材料、たとえば紙、金属箔などを用いてもよい。

緩衝剤は、pH8～12の範囲で緩衝能を持つものであればいずれでも良い。特に炭酸緩衝剤が好適である。

テトラゾリウム塩としては、フルクトサミンと反応して発色するものならば制限なく用いることができるが、中でも3,3'-[3,3'-ジメチキ

シ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]ビス[2-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウムクロリド](NTB)、3,3'-(3,3'-ジメトキシシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]ビス[2,5-ビス(p-ニトロフェニル)-2H-テトラゾリウムクロリド](TNTB)、3,3'-(1,1'-ビフェニル-4,4'-ジイル)ビス(2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムクロリド)(NeoTB)、3-(p-ヨードフェニル)-2-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウムクロリド(1NT)、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロミド(MTT)、2,5-ジフェニル-3-(1-ナフチル)-2H-テトラゾリウムクロリド(TV)などが好ましい。

本発明のフルクトサミン測定用多層分析要素の緩衝剤含有層には、ウリカーゼを含ませることができる。ウリカーゼは、体液中の還元物質である尿酸を短時間で分解するので、フルクトサミン測

定に於ける尿酸の影響を排除することができ、測定時間を短縮することができる。

定における尿酸の影響を排除することができ、測定時間を短縮することができる。

本発明のフルクトサミン測定用多層分析要素は、液体不浸透性支持体材料の上に、緩衝剤含有層、必要に応じて形成される中間層、およびテトラゾリウム塩含有層を順次積層することにより製造できる。

まず、緩衝剤をバインダーと共に適当な溶剤に溶解し、溶液を支持体材料の上に塗布し、乾燥する。

緩衝剤含有層を形成する為のバインダーとしてはポリビニルピロリドン(PVP)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、メチルセルロース(MC)、ポリアクリルアミド、ゼラチンなどの親水性高分子が好ましく使用される。

中間層を形成する場合、適当な樹脂成分を、緩衝剤およびテトラゾリウム塩を溶解しない溶媒に溶解し、溶液を緩衝剤含有層上に塗布し、乾燥して中間層のフィルムを形成する。溶媒としては、イソプロピルアルコール、アセトン、クロロホル

ム、塩化メチル、トルエンなどが好適である。樹脂成分として、HPC、PVPなどが用いられる。

テトラゾリウム塩は、溶液として多孔性マトリックス、例えば濾紙、布、メンブレンフィルターなどに含浸し、乾燥し、要すれば中間層と共に緩衝剤含有層にラミネートする。テトラゾリウム塩の溶解性を良くする為に、界面活性剤を用いても良い。

緩衝剤含有層、中間層およびテトラゾリウム塩含有層の厚さは、適宜定めればよいが、好ましくは、緩衝剤含有層の厚さは、ウェット厚200 μ m、中間層の厚さはウェット厚150 μ m、テトラゾリウム塩含有層の厚さは、250 μ mである。

液体不浸透性支持体、緩衝剤含有層、テトラゾリウム塩含有層および要すれば中間層からなる積層体を適当な大きさ、たとえば5 \times 7mmにカットし、ベースフィルムに両面テープ、接着剤などで固定し、測定に供する。

フルクトサミンの測定は、多層分析要素にフルクトサミンを含む検体を点着し、テトラゾリウム

塩の発色を既知の方法により測定して行うことができる。具体的な方法は以下の実施例において説明する。

[実施例]

次に、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1

緩衝剤含有層を形成する為に、下記成分：

炭酸ナトリウム	3.18g
炭酸水素ナトリウム	0.84g
精製水	86g
PVPK-90	10g

を混合し、調製した塗工液を不透明ポリエチレンテレフタレート(PET)フィルムにウェット厚200 μ mでコーティングし、40℃で30分乾燥する。

テトラゾリウム塩含有層を形成する為に、下記成分：

NTB	700mg
メタノール	10g

精製水 14.3g
を混合して含浸液を調製し、これを、綿又はポリエステル製の布に含浸し、40℃で30分乾燥する。

中間層として、下記成分：

HPC 2g
イソプロパノール 98g

からなる溶液を緩衝剤含有層の上にコーティングし、その上にテトラゾリウム塩含有層をラミネートした後、40℃で30分乾燥する。

得られた積層体を、5mm×7mmにカットし、PET片5mm×80mmの先端に両面テープで固定し、試験片とした。

[直線性]

フルクトサミンを高濃度に含有する人血清を精製水で段階希釈し、その6μlをこの試験片の多層分析要素部分に点着し、37℃でインキュベートし、インキュベート開始後5分から7分での反射率をモニターする。反射率はクベルカームンク(Kubelka-Munk)の式に従ってK/S値に換

と同様に5分～7分の $\Delta K/S$ を測定した。結果を第2表に示す。

第2表

アスコルビン酸 濃度(μg/dl)	5分～7分 $\Delta K/S$
0	0.135
10	0.137
20	0.133
30	0.138
40	0.134

第2表の結果から理解されるように、本発明の多層分析要素はアスコルビン酸の影響をほとんど受けない。

②尿素の影響

人血清に尿酸を添加し、各種尿酸濃度の検体を調製し、各6μlを実施例1と同様に作成した試験片の多層分析要素部分に点着し、37℃でインキュベートする。実施例1と同様に5分～7分の $\Delta K/S$ 値を測定した。結果を第3表に示す。

算し、その差($\Delta K/S$)を求めた。結果を第1表に示す。

第1表

フルクトサミン 濃度(μmol/l)	5分～7分 $\Delta K/S$
0	0.006
116	0.048
232	0.106
348	0.150
464	0.211
580	0.252

これをプロットすると、第1図に示すように良好な希釈直線性が得られた。

実施例2

[体液中の共存物質の影響]

①アスコルビン酸の影響

人血清にアスコルビン酸を添加し、各種アスコルビン酸濃度の検体を調製し、各6μlを実施例1と同様に作成した試験片の多層分析要素部分に点着し、37℃でインキュベートする。実施例1

第3表

尿酸濃度 (mg/dl)	5分～7分 $\Delta K/S$
5.2	0.128
12.2	0.132
19.6	0.140
25.8	0.129
34.0	0.132

$\Delta K/S$ は尿酸によってわずかに高値になる傾向があるが、本発明の多層分析要素は尿酸により実質的に影響を受けないことが分かる。

第2図に示すK/Sの時間変化から、5分以内で尿酸のほぼ全量がNTBと反応していることが判る。

本発明の多層分析要素は、アスコルビン酸および尿酸の他、グルタチオン、ビリルビン、溶血混濁の影響もほとんど受けない。

実施例3

種々の患者血清を用いてリファレンス(Reference)法[ロッシュ(Roche)キット]との相関

を測定した。その結果、第3図に示すように、相関係数 $r=0.98$ と良好な相関性が得られた。

実施例4

緩衝剤含有層を形成する為に、下記成分：

炭酸ナトリウム	0.318g
炭酸水素ナトリウム	0.084g
精製水	8.6g
PVPK-90	1.0g
ウリカーゼ	4000単位

を混合し、調製した塗工液を不透明ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルムにウェット厚 $200\mu\text{m}$ でコーティングし、 40°C で30分乾燥する。

テトラゾリウム塩含有層を形成する為に、下記成分：

NTB	700mg
メタノール	10g
精製水	14.3g

を混合して含浸液を調製し、これを、綿又はポリエステルとナイロン混紡の織布に含浸し、 40°C

で30分乾燥する。

中間層として、下記成分：

HPC	2g
イソプロパノール	98g

からなる溶液を緩衝剤含有層の上にコーティングし、その上にテトラゾリウム塩含有層をラミネートして 40°C で30分乾燥する。

得られた積層体を、 $5\text{mm}\times 7\text{mm}$ にカットし、PET片 $5\text{mm}\times 80\text{mm}$ の先端に両面テープで固定し、試験片とした。

人血清、および人血清に尿酸を添加して尿酸濃度が約 $20\text{mg}/\text{dl}$ と成るように調製した検体の各 $8\mu\text{L}$ を、実施例1および実施例4で作成した試験片それぞれの多層分析要素部分に点着し、実施例2と同様に K/S 値を測定した。結果を第4表および第4図に示す。

第4表

検体	実施例4		実施例1	
	4~6分 $\Delta K/S$	5~7分 $\Delta K/S$	4~6分 $\Delta K/S$	5~7分 $\Delta K/S$
血清	0.148	0.147	0.158	0.149
血清 + 尿酸	0.150	0.148	0.169	0.152

実施例4では、4~6分に反応時間を早めても、尿酸の影響を受けずに問題なくフルクトサミン濃度を測定できることが分かる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1における5~7分での $\Delta K/S$ とフルクトサミン濃度との関係を示すグラフ、

第2図は、実施例2における K/S の時間変化を示すグラフ、

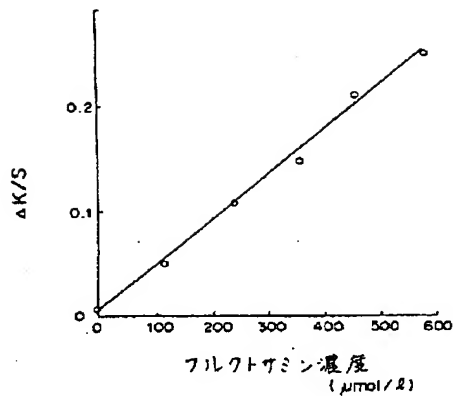
第3図は、本発明による測定と従来法との相関を示すグラフ、および

第4図は、実施例1（点線）と実施例4（実線）の試験片についての K/S の時間変化を示すグラ

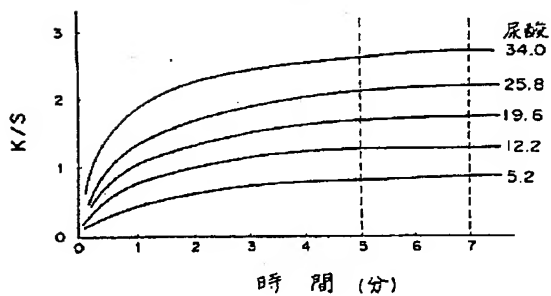
フである。

特許出願人 株式会社 京都第一科学
代理人 弁理士 青山 稔ほか1名

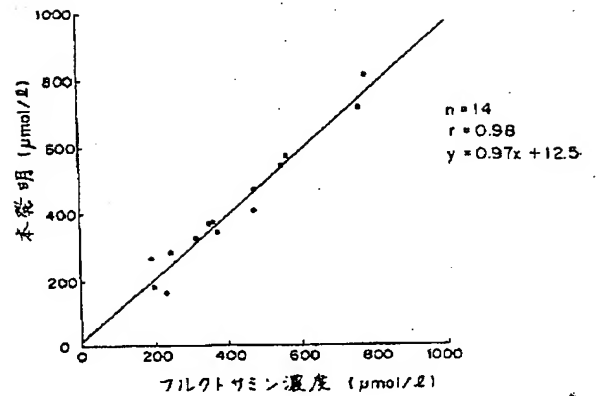
第1図



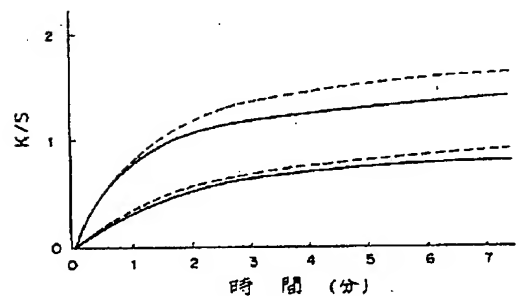
第2図



第3図



第4図



手続補正書

平成 3 年 9 月 20 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 2 年 特許願 第 230912 号

2. 発明の名称

フルクトサミン測定用多層分析用具

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 株式会社京都第一科学

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261
FAX(06)949-0361

氏名 弁護士(6214) 青山 孫

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

明細書の発明の詳細な説明の欄中、次の箇所を補正します。

(1) 第13頁下から第6行、「尿素」とあるを「尿酸」と訂正。

(2) 第14頁下から第5行、「溶血」とあるを「溶血、」と訂正。

以 上

